

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

14.09.00

10-088142
JP00/6303

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 9月17日

REC'D 06 NOV 2000

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第263048号

WIPO PCT

出願人
Applicant(s):

武田薬品工業株式会社

4

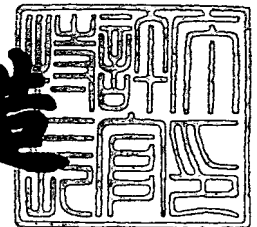
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月20日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3085360

【書類名】 特許願
【整理番号】 A99186
【提出日】 平成11年 9月17日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C07K 1/00
C07K 14/61

【発明の名称】 タンパク質微細粉体の製造法

【請求項の数】 14

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市須磨区道正台1丁目1番8-207号

【氏名】 山縣 豊

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市上山手町66番12-311号

【氏名】 道圓 隆行

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府高槻市赤大路町44番2-202

【氏名】 浅川 直樹

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県西宮市霞町3番20-504号

【氏名】 高田 重行

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100073955

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456

【弁理士】

【氏名又は名称】 内山 務

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】タンパク質微細粉体の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】タンパク質含有溶液を約-300~-10℃/分の冷却速度で凍結後、乾燥することを特徴とするタンパク質微細粉体の製造法。

【請求項 2】タンパク質が、分子量 約5,000ないし1,000,000ダルトンのタンパク質である請求項 1 記載の製造法。

【請求項 3】タンパク質が、ホルモン、サイトカイン、造血因子、増殖因子または酵素である請求項 1 記載の製造法。

【請求項 4】タンパク質が、成長ホルモンまたはインスリンである請求項 1 記載の製造法。

【請求項 5】タンパク質含有溶液を約-300~-10℃/分の冷却速度で凍結後、乾燥し、微粒化处理することを特徴とする請求項 1 記載の製造法。

【請求項 6】タンパク質微細粉体が、約0.5ないし20 μ mの平均粒子径を有するタンパク質微細粉体である請求項 1 記載の製造法。

【請求項 7】タンパク質微細粉体が、タンパク質水溶液中の α -ヘリックス含量に対して約45%以上の α -ヘリックスを保持していることを特徴とする請求項 1 記載の製造法。

【請求項 8】タンパク質含有溶液が、冷媒に塗布または滴下されたタンパク質含有溶液であることを特徴とする請求項 1 記載の製造法。

【請求項 9】タンパク質含有溶液を冷媒に塗布または滴下する際、滴下流体の直径が約0.5ないし40mmである請求項 8 記載の製造法。

【請求項 10】タンパク質含有溶液を液体冷媒に直接接触させないで凍結することを特徴とする請求項 1 記載の製造法。

【請求項 11】タンパク質含有溶液に、揮発性の塩類あるいは水混和性の有機溶媒を添加することを特徴とする請求項 1 記載の製造法。

【請求項 12】請求項 1 記載の製造法で得られたタンパク質微細粉体を用いることを特徴とする徐放性製剤。

【請求項 1 3】生体由来物質または合成ポリマーを徐放性製剤の基剤として用いることを特徴とする請求項 1 2 記載の徐放性製剤。

【請求項 1 4】生体由来物質または合成ポリマーが、生体内分解性ポリマーである請求項 1 3 記載の徐放性製剤。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、タンパク質微細粉体の製造法および、該タンパク質微細粉体を用いることを特徴とする徐放性製剤に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

近年、遺伝子工学および細胞工学の手法の発達により、大腸菌、酵母、動物細胞あるいはヤギ、ハムスター等の生体を用いてタンパク質医薬品が大量に生産され、臨床への応用が図られている。しかしながら、これらのタンパク質は酸性条件および酵素消化に対し極めて反応性が高いため経口吸収されない。そこで一般に皮下あるいは筋肉内投与されるが、生体内での半減期が短いため、頻回投与が必要であり、注射に伴う患者の肉体的負担は無視できないものがある。

例えば、成長ホルモン（以下、GHと略記することがある）は、元来下垂体前葉で生産・分泌される代表的なホルモンで、身体の成長促進に働くほか、糖・脂質代謝、タンパク同化、細胞増殖や分化に関与する等、幅広く多彩な生理作用を有するタンパク質であり、現在では遺伝子組換え技術を用いて大腸菌により大量生産され、医薬品として全世界で広く臨床応用されている。しかし、GHは生体内半減期が短く、有効血中濃度を維持するためには頻回投与が必要である。とりわけ、下垂体性小人症の場合には、乳幼児あるいは若年患者に対して、数ヶ月から 10 年以上の長期にわたる連日皮下投与がなされているのが実状である。

【0 0 0 3】

この様なタンパク質医薬品固有の問題に対処するため、薬物送達システムに関する種々の研究が行われてきた。例えば、タンパク質を長期間にわたって持続放出する徐放剤である。特開平 8 - 2 1 7 6 9 1 号公報（WO 9 6 / 0 7 3 9 9

号公報) には、水溶性ペプチド性生理活性物質を塩化亜鉛水溶液等により水不溶性ないし水難溶性多価金属塩とし、これと生体内分解性ポリマーとを含有してなる徐放性製剤の製造法が開示されている。また、WO 94/12158号公報には、ヒトGH (以下、hGHと略記することがある) と生分解性ポリマーとの徐放性製剤の製法として、hGHとポリマーとを含有する有機溶媒溶液を液体窒素中に噴霧し多孔性粒子として生物活性を保持した形で徐放性マイクロカプセルを調整する方法が開示されている。更に、WO 95/29664号公報には、炭酸亜鉛等を固体状でポリマー溶液に分散させた後、生理活性物質 (ホルモン等) を添加し、生理活性物質と金属カチオンとを別々に生体分解性ポリマーに分散させてなる徐放性マイクロカプセルの製造法が開示されている。

このようにタンパク質の生理活性を保持しながら薬物送達システムを構築する試みは種々なされているものの、高次構造を持つタンパク質固有の問題として、製剤工程中での変性、製剤中での経時的変化による変性、および/または投与後の生体内での変性等に由来するタンパク質の安定性に関する問題が見られる可能性がある。具体的には、徐放性製剤における、製剤内へのタンパク質取り込み効率の低さ、投与初期の過大な薬物放出、長期間にわたる薬物放出制御の困難さ、製剤投与後の低い血中濃度等の問題が解決されないで残る可能性がある。

【0004】

しかしながら、タンパク質を微細な粉体として調製できれば、分子運動性の低下により、さらなる安定性の向上が見込まれる。

タンパク質微細粉体の製造法として、特公平7-39339号公報にはタンパク質水溶液を液化ガス中に噴霧し凍結後、乾燥する方法が開示されている。

この他にも、タンパク質微細粉体の製造法として、ジャーナル オブ ファーマシューティカルサイエンス (Journal of Pharmaceutical Sciences) 第87巻、152頁 (1998) にスプレードライ法が報告されているが、噴霧して得られたタンパク質水溶液粒子径に逆相関してタンパク質の変性度が上昇すること、それを抑制するためには界面活性剤を多量に添加しなければならないことが記載されている。

また、特開平9-248177号公報には凍結温度以下冷却した金属板上に微

生物菌体培養物の小滴を滴下して急速凍結させる乾燥微生物菌体の製造法が記載されている。

凍結乾燥時の冷却速度は、一般の医薬品の予備凍結では、薬物と水を共晶させるため、ゆっくりと冷却されるか、もしくは凍結後再加熱して結晶を析出させる方法を採用することがある（小林正和著「医薬品製造と凍結乾燥技術」）。この様な方法を採用するとき冷却速度は $-10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ より遅い。一方、液体窒素等の液化ガスに水溶液を噴霧する場合の冷却速度は極めて速く、例えば液体窒素の場合 $-300^{\circ}\text{C}/\text{分}$ より速い。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

液化ガス中に噴霧し凍結後、乾燥するタンパク質微細粉体の製造法では、スプレードライ法と同様に変性が生じる可能性が高く、さらに冷媒に液化ガスを用いるため、断熱や温度差による機器材質の膨張収縮への対応、無菌保持、および液化ガスの排気等に大がかりで高価な設備が必要になる。

また、多量の界面活性剤を用いることにより、平均粒子径が数ミクロンのタンパク質微細粉体を得られるものの、多量の界面活性剤を含有するため、その用途は限定される。

そこで、高次構造を高く保持した安定なタンパク質微細粉体を、液化ガスに接触させることなく、簡便に提供することが求められている。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは前記の問題を解決するため鋭意研究を進め、タンパク質微細粉体を製造する際、タンパク質含有溶液を凍結させるための冷却速度を調整することにより、タンパク質微細粉体を得られることを見いだした。

また、凍結の際にタンパク質含有溶液を塗布または滴下することにより、高次構造を高く保持したタンパク質微細粉体を得られることを見いだした。

さらに、前記凍結を医薬品の凍結乾燥に通常用いられる凍結乾燥機の棚を用いることにより、より安価に、さらに簡便に製造することができることを見出した。

加えて、本発明者らは、こうして得られたタンパク質微細粉体を徐放性製剤に用いることにより、該製剤におけるタンパク質の封入率、投与初期の過大な薬物放出および徐放性が改善されることを見いだした。

これらの知見に基づき、本発明者らは発明を完成させた。

【0007】

すなわち、本発明は、

- (1) タンパク質含有溶液を約-300~-10℃/分の冷却速度で凍結後、乾燥することを特徴とするタンパク質微細粉体の製造法、
- (2) タンパク質が、分子量 約5,000ないし1,000,000ダルトンのタンパク質である上記(1)記載の製造法、
- (3) タンパク質が、ホルモン、サイトカイン、造血因子、増殖因子または酵素である上記(1)記載の製造法、
- (4) タンパク質が成長ホルモンまたはインスリンである上記(1)記載の製造法、
- (5) タンパク質含有溶液を約-300~-10℃/分の冷却速度で凍結後、乾燥し、さらに微粒化处理することを特徴とする上記(1)記載の製造法、
- (6) タンパク質微細粉体が、約0.5ないし20 μ mの平均粒子径を有するタンパク質微細粉体である上記(1)記載の製造法、
- (7) タンパク質微細粉体が、タンパク質水溶液中の α -ヘリックス含量に対して約45%以上の α -ヘリックスを保持していることを特徴とする上記(1)記載の製造法、
- (8) タンパク質含有溶液が、冷媒に塗布または滴下されたタンパク質含有溶液であることを特徴とする上記(1)記載の製造法、
- (9) タンパク質含有溶液を冷媒に塗布または滴下する際、滴下流体の直径が約0.5ないし40mmである上記(8)記載の製造法、
- (10) タンパク質含有溶液を液体冷媒に直接接触させないで凍結することを特徴とする上記(1)記載の製造法、
- (11) タンパク質含有溶液に、揮発性の塩類あるいは水混和性の有機溶媒を添加することを特徴とする上記(1)記載の製造法、

(12) 上記(1)記載の製造法で得られたタンパク質微細粉体を用いることを特徴とする徐放性製剤、

(13) 生体由来物質または合成ポリマーを徐放性製剤の基剤として用いることを特徴とする上記(12)記載の徐放性製剤、

(14) 生体由来物質または合成ポリマーが、生体内分解性ポリマーである上記

(13)記載の徐放性製剤、

(15) タンパク質含有溶液を、噴霧して凍結しないことを特徴とする上記(1)記載の製造法、

(16) 塗布または滴下前に約-25℃以下に冷却した冷媒1300cm²当たり、約10～250mL/5分の速度で、タンパク質含有溶液を塗布または滴下することを特徴とする凍結である上記(1)記載の製造法、

(17) 減圧下乾燥することを特徴とする上記(1)記載の製造法、および、

(18) 凍結乾燥機の棚を用いて凍結する上記(1)記載の製造法に関する。

【0008】

本発明におけるタンパク質は、天然物、合成物、半合成物、あるいは遺伝子組換え法により作製されたもの等のいずれでもよく、更にそれらの誘導体、類縁体ないしムテインでもよい。一般に、高純度のタンパク質を大量に得るためには、遺伝子組換え法が用いられることが多い。

本発明におけるタンパク質としては、好ましくは分子量約5,000ないし約1,000,000ダルトン、さらに好ましくは分子量約6,000ないし約200,000ダルトンのタンパク質が挙げられる。

本発明におけるタンパク質としては、具体的には、ホルモン、サイトカイン、造血因子、増殖因子、酵素等が挙げられる。

【0009】

前記ホルモンとしては、作動性あるいは拮抗性のいずれの作用機作を有するものでもよい。ホルモンとしては、具体的には、インスリン、成長ホルモン(GH)、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、ヒト絨毛ゴナドトロピン(HCG)、サイモシン(チモシン)、副甲状腺ホルモン(PTH)等、好ましくはインスリンおよび

成長ホルモン、より好ましくは成長ホルモンが挙げられる。

該成長ホルモンとしては、いずれの種由来のものでも良いが、好ましくはヒト成長ホルモンが挙げられる。また、脳下垂体等から抽出される天然由来のものも本発明に用いられるが、好ましくは遺伝子組換え型GH（特公平6-12996号公報、特公平6-48987号公報参照）であり、更に好ましくはN末端にメチオニンを有さない天然型と同じ構造を有する組換え型hGHである。該GHとしては金属塩（金属複合体も含む。例えば、金属としては亜鉛等が挙げられる。）であってもよいが、実質的に金属を含有しないGHも用いられる。hGHとして、分子量約22Kダルトンのみならず、分子量約20Kダルトンのもの（特開平7-101877号公報、特開平10-265404号公報参照）を用いてもよい。また、hGHとして、hGHの誘導体あるいはその関連タンパク質（WO99/03887号公報参照）を用いてもよい。

【0010】

前記サイトカインとしては、例えばリンホカイン、モノカイン等が用いられる。リンホカインとしては、例えばインターフェロン類（アルファ型、ベータ型、ガンマ型等）、インターロイキン類（例えば、IL-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12等）等が用いられる。該モノカインとしては、例えばインターロイキン-1（IL-1）、腫瘍壊死因子（TNF）等が用いられる。サイトカインとしては、好ましくはリンホカイン等、更に好ましくはインターフェロン等、特に好ましくはインターフェロンアルファ等である。

【0011】

前記造血因子としては、例えばエリスロポエチン（EPO）、コロニー刺激因子（G-CSF, GM-CSF, M-CSF等）、トロンボポエチン（TPO）、血小板増殖刺激因子、メガカリオサイトポテンシエーター等が用いられる。

前記増殖因子としては、例えば、塩基性あるいは酸性の繊維芽細胞増殖因子（FGF）あるいはこれらのファミリー（例えば、EGF、TGF- α 、TGF- β 、PDGF、酸性FGF、塩基性FGF、FGF-9等）、神経細胞増殖因子（NGF）あるいはこれらのファミリー（例えば、BDNF、NT-3、NT-4、CNTF、GDNF等）、インスリン様成長因子（例えば、IGF-1, I

G F - 2 等)、骨増殖に関与する因子 (BMP) あるいはこれらのファミリー等が用いられる。

【 0 0 1 2 】

前記酵素としては、例えばスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、ウロキナーゼ、ティッシュプラスミノゲンアクティベーター (TPA)、アスパラギナーゼ、カリクレイン等が用いられる。

この他にも本発明におけるタンパク質として、サイモポエチン、血中胸腺因子 (FTS) 及びその誘導体 (米国特許第 4, 2 2 9, 4 3 8 号参照)、及びその他の胸腺因子 [医学のあゆみ、第 1 2 5 巻、第 1 0 号、8 3 5 - 8 4 3 頁 (1 9 8 3 年)] 等を用いることができる。

本発明におけるタンパク質としては、好ましくはホルモン、より好ましくは成長ホルモンまたはインスリン、さらに好ましくはヒト成長ホルモンが用いられる。

【 0 0 1 3 】

本発明におけるタンパク質は、金属を含有するタンパク質であってもよい。金属を含有するタンパク質の金属含有量は、好ましくは約 0.1 % (w/w) 以下、さらに好ましくは約 0.01 % (w/w) 以下、より好ましくは 0.001 % (w/w) 以下、とりわけ実質的に金属を含まないタンパク質が最適である。金属を含有するタンパク質として、例えば、結晶性インスリンが挙げられる。結晶性インスリンは、通常、亜鉛、ニッケル、コバルト、カドミウム等の少量の重金属を含んでいる。亜鉛を 0.4 % (w/w) を含んでいるインスリンは 6 量体で存在し、それ自身で安定に存在し、生体内分解性高分子重合物の金属塩との相互作用が弱められると考えられている。

本発明におけるタンパク質は、前もって金属を除去したタンパク質であってもよい。タンパク質の金属を除去する方法としては公知の方法が用いられる。例えば、インスリンにおいては、インスリンの塩酸酸性水溶液を水あるいは酢酸アンモニウム塩溶液に対して透析した後、凍結乾燥することにより、金属含量が極めて低いアモルファス状態のインスリンを得ることができる。

また、タンパク質を得る際に、所望のタンパク質を含有する組織・体液、化学

合成粗調製物、あるいは組換え細胞・菌体から、それぞれ当該タンパク質を純化・精製する必要がある時には、一般的なタンパク質の分離精製法が使用できる（「タンパク質」、佐竹一夫著、朝倉書店；「生理活性ペプチド」、ファルマシアレビュー、No.3、日本薬学会）。それらの分離精製法の中でもとりわけ、幾つかの液体クロマトグラフィーを組み合わせることにより（「タンパク質・ペプチドの高速液体クロマトグラフィー」、宇井信生ら共編、化学同人）、高純度のタンパク質をその生理活性を損なうことなく収率よく得ることができる。その際、分離精製法の最終工程において、脱塩操作に供されることが好ましい。

【0014】

本発明のタンパク質含有溶液の溶媒は、タンパク質を溶解するものであれば特に限定されない。該溶媒としては、好ましくは凝固点が約 -130°C 以上の溶媒が挙げられる。該溶媒の具体例としては、水、アルコール類（例、メタノール、エタノール、イソプロパノール等）または水混和性溶媒（例、前記アルコール類と水との混合溶媒、水とアセトン等の有機溶媒との混合溶媒等）等が挙げられ、好ましくは水が用いられる。水混和性溶媒に用いられる有機溶媒は、後述する水混和性の有機溶媒としての役割をも有する。

【0015】

前記溶媒を用いたタンパク質含有溶液は、揮発性の塩類あるいは水混和性の有機溶媒が添加されていることが好ましい。このような揮発性の塩類あるいは水混和性の有機溶媒の添加により得られるタンパク質水溶液を、更に凍結乾燥することにより、取り扱いが容易で（操作性のよい）、かつ微細な（粒子径の小さな）タンパク質粉体を製造することができる。

該タンパク質含有溶液に添加される揮発性の塩類としては、例えばアンモニウム塩（例えば酢酸アンモニウム、重炭酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム等、好ましくは酢酸アンモニウム等）が挙げられる。これらは適宜の割合で混合して用いてもよい。揮発性の塩類のタンパク質含有溶液への添加量は、モル比において、例えば約10倍ないし約80倍モルであり、好ましくは約10倍ないし約70倍モルであり、さらに好ましくは約15倍ないし約70倍モルであり、より好ましくは約15倍ないし約50倍モルであり、最も好ましくは

約 1 5 倍ないし約 4 0 倍モルである。

該タンパク質含有溶液に添加される水混和性の有機溶媒としては、例えばアルコール類（例えば、メタノール、エタノール、イソプロパノール等、好ましくはメタノール、エタノール等）、アセトン等が挙げられる。これらは適宜の割合で混合して用いてもよいが、好ましくはアルコール類、特にエタノールを単独で用いることが望ましい。また、タンパク質含有溶液への添加量（濃度）は、体積比において約 0.03 ないし 0.5 % (V/V) であり、好ましくは約 0.06 ないし 0.25 % (V/V)、更に好ましくは約 0.1 ないし 0.15 % (V/V) である。

該タンパク質含有溶液に添加される水混和性の揮発性の塩類及び／又は有機溶媒は、単独で用いてもよいし、適宜組み合わせ用いてもよい。水混和性の有機溶媒及び揮発性の塩類を組み合わせ用いる時は、上記のそれぞれの添加量に従って、タンパク質含有溶液に添加することができる。

【0016】

凍結操作に供するタンパク質含有溶液の濃度は、特に限定されないが、例えば 0.01 % (W/V) ないし 30 % (W/V)、好ましくは 0.03 % (W/V) ないし 10 % (W/V)、特に好ましくは 0.05 % (W/V) ないし 3 % (W/V) 等である。例えば、タンパク質が hGH である場合のタンパク質含有溶液の濃度は、好ましくは約 0.01 ないし約 5 % (W/V)、より好ましくは約 0.05 ないし約 0.5 % (W/V) である。

【0017】

本発明におけるタンパク質含有溶液の凍結および乾燥のための方法は、特に限定されないが、減圧下乾燥することが好ましい。例えば、凍結乾燥機で連続した工程で行っても、凍結乾燥機とは別のところで凍結させたタンパク質含有溶液を凍結乾燥機で乾燥させてもよい。

前記凍結のための装置は特に限定されないが、タンパク質微細粉体を、安価に、そして簡便に製造する観点から、通常医薬品注射剤を凍結乾燥するときを使用される凍結乾燥装置内の棚で行うことが好ましい。該凍結乾燥機に関しては、小林正和著「医薬品製造と凍結乾燥技術」（製剤と機械、No. 17～23、25～35、38

～46) に詳しい。それによると、通常のブラインを用いる冷却では -70℃までの温度を下げる事が可能である。これらの凍結乾燥機としては、例えば、共和真空技術株式会社製（例、RL シリーズ、RLC シリーズ、RLE シリーズ、R2L シリーズ、R2LW シリーズ、およびTriomaster シリーズ）、日本真空技術株式会社製（例、DF シリーズ、DFM シリーズ）等が挙げられる。また、これらの凍結乾燥機の予備凍結庫は本来医薬品注射剤製造用に無菌無塵に対応できるように設計されていることから、タンパク質微細粉体の製造に適している。凍結乾燥機の冷却熱媒体として液化ガスを一次媒体とし、二次媒体を介して導入することにより、棚温度を通常のブラインで達成されるより更に低下させることも可能である。例えば、一次媒として液体窒素を用い、二次媒体としてハイドロフルオロエーテル（HFE：スリーエム（3M）社製）を介して冷却すれば、HFE-7100（スリーエム（3M）社製）で-135℃、HFE-72100（スリーエム（3M）社製）で-117℃まで、それぞれ冷却することが可能になる。この様な方法を用いることで、タンパク質含有溶液を直接液化ガスに接触させることが回避され、液化ガスの無菌無塵処理という困難な問題に直面する必要がなくなる。好ましい棚の温度は約-130～-20℃、さらに好ましくは約-100～-30℃、より好ましくは約-80～-40℃である。この様に凍結乾燥機の棚を用いてタンパク質含有溶液を凍結することにより、その後、速やかに真空乾燥工程に移行することが可能になる。なお、凍結は凍結乾燥機の棚の上に置かれた冷媒上で行うことが好ましい。該冷媒は、特に限定されないが、好ましくはタンパク質含有溶液を塗布または滴下可能な冷媒、例えば板等、具体的にはトレイ等が好ましい。前記板およびトレイ等は平面には限定されず凹凸を有していても、弯曲していてもよい。前記板およびトレイ等の材質は本発明の冷却速度に耐えられるものであればいかなる材質でもよいが、好ましくは金属（例えば、ステンレス等）製が用いられる。

また、凍結乾燥機とは別のところで凍結させたタンパク質含有溶液を凍結乾燥機で乾燥させる場合は、例えば、タンパク質含有溶液を凍結した後、その状態を保持したまま、凍結乾燥機の棚に移送して乾燥する方法が挙げられる。

【0018】

本発明におけるタンパク質含有溶液の冷却速度は、目的とするタンパク質微細

粉体の平均粒子径、タンパク質含有溶液の種類、タンパク質濃度、添加物濃度等により、適宜制御される。本発明におけるタンパク質含有溶液の冷却速度は、通常、約-300~-10℃/分、好ましくは約-250~-20℃/分、より好ましくは約-210℃/分~-30℃/分である。

前記冷却速度を得る方法として、例えば、塗布または滴下前に約-25℃以下（好ましくは約-100から-25℃、より好ましくは約-100~-30℃、さらに好ましくは約-80から-40℃）に冷却した冷媒1300cm²当たり、約10~250mL/5分、好ましくは約15~200mL/5分で、より好ましく約20~175mL/5分の速度で、タンパク質含有溶液を塗布または滴下する方法が挙げられる。なお、塗布または滴下中の冷媒の温度は約-2℃程度になってもよい。

【0019】

本発明における塗布とは、タンパク質含有溶液の充填ノズルより、タンパク質含有溶液を液滴となることなく充填することを示す。その際、塗布は断続的、あるいは連続的、いずれの方法で行ってもよい。塗布を断続的に行う場合、冷媒または塗布液の凍結部表面温度が-25℃以下になるまで、塗布と塗布の間に時間的間隔をおくことが好ましい。

本発明における滴下とは、液滴を形成させ滴下させることを示す。

タンパク質含有溶液を塗布または滴下する際の、タンパク質含有溶液の滴下流体の直径は好ましくは約0.5~40mm、さらに好ましくは約0.7~20mm、より好ましくは約1~5mmである。

本発明において、タンパク質含有溶液を塗布または滴下する際、冷媒上に予め、氷床（ice laying）を作成しておくことも可能である。

また、本発明において、タンパク質含有溶液を凍結させる際、タンパク質含有溶液を層状に凍結させることも可能である。その際の凍結層の厚さは、好ましくは約0.5~100mm、さらに好ましくは約1~80mm、より好ましくは約3~50mmである。

。

【0020】

本発明の方法により得られたタンパク質微細粉体（平均粒子径は、好ましくは約0.5~20μm、さらに好ましくは0.7~10μm、より好ましくは約1~5μm）を

、より微細な粒子にするために、さらに微粒化处理することが好ましい。微粒化处理には、医薬品製剤の調製において知られた種々の粉体粉碎処理方法を用いることができる。該粉体粉碎処理法として、例えば、乾式粉碎法としては、ジェットミル法等が挙げられる、また湿式粉碎法としては、タンパク質微細粉体をその不溶性溶媒に分散させた後、超音波処理（プローブ型およびバス型）、攪拌型粉碎器（ポリトロン（キネマチカ社製）、ミニミクサー、フィルミックス（特殊機化社製）、クレアミックス（Mテック社））等で処理後に該溶媒を除去する方法が挙げられる。また、得られたタンパク質微細粉体を徐放性製剤に適用する場合は、タンパク質微細粉体を直接、基剤（例、生体内分解性ポリマー溶液）中に添加後、超音波もしくは攪拌型粉碎器により微粒化处理を行うことも可能である。

微粒化处理後のタンパク質微細粉体の平均粒子径はそれを応用する薬物送達システムによっても異なるが、一般に、好ましくは約 $0.5\sim 20\mu\text{m}$ 、さらに好ましくは $0.7\sim 10\mu\text{m}$ 、より好ましくは約 $1\sim 5\mu\text{m}$ である。本発明におけるタンパク質微細粉体の平均粒子径は、レーザー回折式粒度分布測定装置（SALD 2000A：島津製作所株式会社製）により測定することができる。前記測定においてタンパク質微細粉体は、タンパク質微細粉体の不溶性溶媒（例えば、ジクロロメタン等）に分散後、前記粒度分布測定装置の測定可能範囲まで、適宜、該溶媒にて希釈し供される。

【0021】

本発明により製造されたタンパク質微細粉体は、本発明の製造法を行う前における水溶液中のタンパク質と比較しても、高次構造を高い割合で保持している。

タンパク質微細粉体中の二次構造は、FT-IR スペクトル解析より確認することが可能である。この解析はカーペンターらの総説（ユーロピアン ジーナル オブ ファーマシューティクス アンド バイオファーマシューティクス（European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics）45巻 231-238頁 1998年）に詳しい。それによると、凍結乾燥して得られたタンパク質微細粉体中の二次構造の1つである α -ヘリックスの含量は、水溶液中のタンパク質の含量より低下することが報告されており、変性度が高いほどその低下率が高いことが示されている。そこで、FT-IRスペクトル解析して得られる本発明の製造法を行う前に

おける水溶液中のタンパク質の α -ヘリックス含量に対する本発明の製造法で得られたタンパク質微細粉体中の α -ヘリックス含量の割合から、タンパク質の高次構造の変性度を定義できる。

前記方法により、タンパク質の変性度を定義した時、本研究により得られたタンパク質微細粉体は α -ヘリックスを約 4 5 % 以上保持していることが好ましく、約 5 0 % 以上保持していることがさらに好ましい。

【 0 0 2 2 】

本発明で得られた高次構造（具体的には二次構造、より具体的には α -ヘリックス）を保持したタンパク質微細粉体は種々の薬物送達システムに応用される。その投与経路としては、経肺、経粘膜（眼、口腔、鼻、子宮、膣）、経口、経皮、等が挙げられる。タンパク質微細粉体は粉体のまま投与することもできるが、種々の剤形（例、錠剤、顆粒剤、徐放性製剤等）に処方して用いることができ、好ましくは徐放性製剤に処方して投与される。該徐放性製剤は、タンパク質微細粉体と後述する種々の基剤とを用いることにより、打錠法、スプレーチリング法、スプレードライ法、または乳化法、等により処方することができる。

【 0 0 2 3 】

前記徐放性製剤を処方する際に用いる基剤は、生体由来のもの、あるいは合成により得られたもの（例、合成ポリマー）のいずれでもよいが、合成ポリマーを用いることが多い。

生体由来の基剤としては、ゼラチン、コラーゲン、油脂（脂質、トリグリセライド等）、血清由来タンパク質（アルブミン、グロブリン等）、ケラチン、キチン、キトサン、プルラン、セルロース類（ヒドロキシメチルセルロール、カルボキシメチルセルロール等）が挙げられる。

合成ポリマーとしては、生体内分解性ポリマーと生体内非分解性ポリマーのいずれを用いることもできるが、生体内非分解性ポリマーを用いることが好ましい。

【 0 0 2 4 】

前記徐放性製剤の基剤に用いられる生体内分解性ポリマーとしては、例えば α -ヒドロキシカルボン酸類（例えば、グリコール酸、乳酸等）、ヒドロキシジカ

ルボン酸類（例えば、リンゴ酸等）、ヒドロキシトリカルボン酸（例えば、クエン酸等）等の1種以上から無触媒脱水重縮合で合成され、遊離のカルボキシル基を有する重合体あるいはこれらの混合物、ポリ- α -シアノアクリル酸エステル、ポリアミノ酸（例えば、ポリ- γ -ベンジル-L-グルタミン酸等）、無水マレイン酸系重合体（例えば、スチレン-マレイン酸重合体等）等が挙げられる。これらはホモポリマーまたはコポリマーのいずれであってもよい。重合の形式は、ランダム、ブロック、グラフトのいずれでもよい。また、上記の α -ヒドロキシカルボン酸類、ヒドロキシジカルボン酸類、ヒドロキシトリカルボン酸類が分子内に光学活性中心を有する場合、D-，L-，DL-体のいずれも用いることができる。

生体内分解性ポリマーとしては、好ましくは、末端に遊離のカルボキシル基を有する生体内分解性ポリマー、例えば α -ヒドロキシカルボン酸類（例えば、グリコール酸、乳酸等）から合成された重合体（例えば、乳酸重合体、乳酸-グリコール酸共重合体等）、ポリ- α -シアノアクリル酸エステル等が、より好ましくは α -ヒドロキシカルボン酸類から合成された重合体等が、さらに好ましくは乳酸-グリコール酸重合体等が挙げられる。本明細書においては、ポリ乳酸、ポリグリコール酸等の単重合体のみならず乳酸-グリコール酸共重合体も含めて、単に乳酸-グリコール酸重合体と称することがある。

【0025】

生体内分解性ポリマーとして乳酸-グリコール酸重合体（乳酸-グリコール酸共重合体又は単重合体）を用いる場合、その組成比（モル%）は約100/0ないし約40/60が好ましく、約85/15ないし約50/50が更に好ましい。

乳酸-グリコール酸重合体の重量平均分子量は、約3,000ないし約50,000が好ましく、約3,000ないし約25,000がより好ましく、約5,000から約20,000が更に好ましい。

乳酸-グリコール酸重合体の分散度（重量平均分子量/数平均分子量）は約1.2ないし約4.0が好ましく、約1.5ないし約3.5が更に好ましい。

【 0 0 2 6 】

本明細書での乳酸-グリコール酸重合体の重量平均分子量は、重量平均分子量が 1 2 0, 0 0 0、5 2, 0 0 0、2 2, 0 0 0、9, 2 0 0、5, 0 5 0、2, 9 5 0、1, 0 5 0、5 8 0、1 6 2 の 9 種類のポリスチレンを基準物質としてゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) で測定したポリスチレン換算の値を示す。また、乳酸-グリコール酸重合体の分散度は、前記乳酸-グリコール酸重合体の重量平均分子量の値から算出した値である。乳酸-グリコール酸重合体の重量平均分子量の測定は、GPC カラム KF 8 0 4 L x 2 (昭和電工製)、RI モニター L-3 3 0 0 (日立製作所製) を使用し、移動相としてクロロホルムを用いて行う。

【 0 0 2 7 】

前記末端に遊離のカルボキシル基を有する生体内分解性ポリマーとは、末端基定量による数平均分子量と上記の GPC 測定による数平均分子量がほぼ一致するポリマーであり、末端基定量による数平均分子量は以下のようにして算出される。

約 1 g ないし約 3 g の生体内分解性ポリマーをアセトン (2 5 ml) とメタノール (5 ml) との混合溶媒に溶解し、フェノールフタレインを指示薬としてこの溶液中のカルボキシル基を 0.0 5 N アルコール性水酸化カリウム溶液で、室温 (2 0 ℃) で攪拌下、速やかに滴定して末端基定量による数平均分子量を次式で算出した。

末端基定量による数平均分子量 = $20000 \times A / B$

A : 生体内分解性ポリマーの質量 (g)

B : 滴定終点までに添加した 0.0 5 N アルコール性水酸化カリウム溶液 (ml)

末端基定量による数平均分子量が絶対値であるのに対して、GPC 測定による数平均分子量は、各種分析・解析条件 (例えば、移動相の種類、カラムの種類、基準物質、スライス幅の選択、ベースラインの選択等) によって変動する相対値であるため、一義的な数値化は困難であるが、両測定による数平均分子量がほぼ一致するとは、例えば、 α -ヒドロキシカルボン酸類から合成された重合体において、末端基定量による数平均分子量が GPC 測定による数平均分子量の約 0.9

5 倍から約 2 倍の範囲内であること、好ましくは約 0.7 倍から約 1.5 倍の範囲内であることをいう。

例えば、1 種類以上の α -ヒドロキシカルボン酸類から無触媒脱水重縮合法で合成され、末端に遊離のカルボキシル基を有する重合体では、GPC 測定による数平均分子量と末端基定量による数平均分子量とがほぼ一致する。これに対し、環状二量体から触媒を用いて開環重縮合法で合成され、末端に遊離のカルボキシル基を本質的には有しない重合体では、末端基定量による数平均分子量が GPC 測定による数平均分子量の約 2 倍以上に大きく上回る。この相違によって末端に遊離のカルボキシル基を有する重合体は、末端に遊離のカルボキシル基を有しない重合体と明確に区別することができる。

【0028】

末端に遊離のカルボキシル基を有する乳酸-グリコール酸重合体は、自体公知の製造法、例えば特開昭 61-28521 号公報に記載の方法（例えば無触媒下の脱水重縮合反応又は無機固体酸触媒下での脱水重縮合反応による製造方法等）に従って製造することができる。

乳酸-グリコール酸重合体の分解・消失速度は、組成比あるいは重量平均分子量によって大きく変化するが、一般的にはグリコール酸分率が低いほど分解・消失が遅いため、グリコール酸分率を低くするかあるいは分子量を大きくすることによって放出期間を長くすること（例えば、約 6 ヶ月）ができる。逆に、グリコール酸分率を高くするかあるいは分子量を小さくすることによって放出期間を短くすること（例えば、約 1 週間）もできる。例えば、1 週間ないし 2 ヶ月型徐放性製剤とするには、前記組成比及び重量平均分子量の範囲の乳酸-グリコール酸重合体を用いるのが好ましい。

【0029】

従って、本発明において用いる生体内分解性ポリマーの組成は、目的とする生理活性ポリペプチドの種類、所望の徐放期間等に応じて、適宜選択されることが好ましい。その具体例としては、例えば、タンパク質として GH を用いる場合、乳酸-グリコール酸重合体を用いることが好ましく、該乳酸-グリコール酸重合体としては、その乳酸/グリコール酸組成比（モル%）が約 85/15 ないし約

50/50の乳酸-グリコール酸共重合体が好ましく、更に好ましくは約75/25ないし約50/50の乳酸-グリコール酸共重合体である。またその重量平均分子量は約8,000ないし約20,000が好ましく、更に好ましくは約10,000ないし約20,000である。また、乳酸-グリコール酸重合体の分散度（重量平均分子量/数平均分子量）は約1.2ないし約4.0が好ましく、更に好ましくは約1.5ないし約3.5である。

乳酸-グリコール酸重合体は、前記公報記載の方法等、公知の方法に従い製造できる。該重合体は無触媒脱水重縮合で製造されたものが好ましい。前記GPC測定法による数平均分子量と末端基定量法による数平均分子量とが、ほぼ一致する乳酸-グリコール酸重合体(PLGA)を用いることが好ましい。

該重合体は組成比及び/または重量平均分子量の異なる2種の乳酸-グリコール酸重合体を任意の割合で混合して用いてもよい。このような例としては、組成比（乳酸/グリコール酸）（モル%）が約75/25で重量平均分子量が約10,000の乳酸-グリコール酸共重合体と、組成比（乳酸/グリコール酸）（モル%）が約50/50で重量平均分子量が約12,000の乳酸-グリコール酸共重合体との混合物等が用いられる。混合する際の重量比は、好ましくは約25/75ないし約75/25である。

【0030】

徐放性製剤の基剤として用いる生体内分解性ポリマーは、前記した生体内分解性ポリマーの金属塩であってもよく、例えば、WO97/01331号公報に記載の各種生体内分解性ポリマーの多価金属塩等が用いられる。好ましくは乳酸-グリコール酸重合体の多価金属塩（さらに好ましくは亜鉛塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等、より好ましくは亜鉛塩等）等が用いられる。該多価金属塩の金属種としては、生体に悪影響を及ぼさない化合物であれば特に限定されず、例えば2価（例、鉄、亜鉛、銅、カルシウム、マグネシウム、アルミニウム、スズ、マンガン等）、3価（例、鉄、アルミニウム、マンガン等）、4価（例、スズ等）などの多価金属も用いることができる。

本明細書においては、生体内分解性ポリマーが金属塩の場合も含めて生体内分解性ポリマーと称することがあり、例えば乳酸-グリコール酸重合体が多価金属

塩の場合も乳酸-グリコール酸重合体と称することがある。

これらの生体内分解性ポリマーの多価金属塩はW O 9 7 / 0 1 3 3 1 号公報に記載の方法及びこれに準じる方法により製造することができる。

また、生体内分解性ポリマーの多価金属塩が亜鉛塩の場合には、生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛とを有機溶媒中で反応させることによって製造することもできる。生体内分解性ポリマーの亜鉛塩は、例えば以下示す方法で製造することができる。

まず生体内分解性ポリマーと酸化亜鉛とを有機溶媒中に共存させて、生体内分解性ポリマー・酸化亜鉛体の有機溶媒溶液を製造する。この際、生体内分解性ポリマーの溶液中濃度は分子量、有機溶媒等の種類によって異なるが、例えば約0.1ないし約80% (W/W)、好ましくは約1ないし約70% (W/W)、更に好ましくは約2ないし約60% (W/W) である。また、添加する酸化亜鉛量は、特開平10-231252号公報に記載されたように、有機溶媒の種類によって異なるが、例えば生体内分解性ポリマー量の約0.001ないし約2% (W/W)、好ましくは約0.01ないし約1.5% (W/W)、更に好ましくは約0.1ないし約1% (W/W) である。有機溶媒への生体内分解性ポリマー及び酸化亜鉛の添加順序は、生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液に酸化亜鉛を粉末状であるいは該有機溶媒に懸濁した状態で添加してもよく、逆に酸化亜鉛の有機溶媒懸濁液中に生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液を添加してもよい。また、両者を粉末状で混和後、有機溶媒を添加してもよい。

【0031】

徐放性製剤の製造において生体内分解性ポリマーの溶解に用いる有機溶媒は、沸点120℃以下であることが好ましい。該有機溶媒としては、例えばハロゲン化炭化水素（例えば、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素等）、アルコール類（例えば、エタノール、メタノール、1,4-ブタンジオール、1,5-ペンタンジオール等）、酢酸エチル、アセトニトリル等が挙げられる。これらは適宜の割合で混合して用いてもよい。有機溶媒を単独で用いる場合、例えばジクロロメタン、アセトニトリル等が好ましい。有機溶媒を混合溶媒として用いる場合、例えばハロゲン化炭化水素（例えば、ジクロロメタン、クロロホルム等）と、

アルコール類（例えば、エタノール、メタノール、1,4-ブタンジオール、1,5-ペンタンジオール等）あるいはアセトニトリルとの組み合わせが好ましい。特に、ジクロロメタンとアセトニトリルとの組み合わせが汎用される。ハロゲン化炭化水素と、アルコール類あるいはアセトニトリルとの混合比（体積比）は約 40 : 1 ないし約 1 : 1 であり、好ましくは約 20 : 1 ないし約 1 : 1 である。

特に、ハロゲン化炭化水素（ジクロロメタン等）を単独、あるいはハロゲン化炭化水素とアセトニトリルとの 9 : 1 ないし 1 : 1 の混合溶媒を用いることが望ましい。また、生体内分解性ポリマーの溶液中濃度は分子量、有機溶媒等の種類によって異なるが、例えば約 0.01 ないし約 80 % (W/W)、好ましくは約 0.1 ないし約 70 % (W/W)、更に好ましくは約 1 ないし約 60 % (W/W) である。

【0032】

徐放性製剤は、水混和性の有機溶媒及び／又は揮発性塩類を添加した生理活性ポリペプチド溶液を凍結乾燥して得られる粉体（S）を、生体内分解性ポリマーを溶解した有機溶媒液（O）に分散させた、S/O型分散液から溶媒を除去することにより製造される。その製造法としては、例えば（a）水中乾燥法（S/O/W法）、（b）相分離法（コアセルベーション法）及び（c）噴霧乾燥法、あるいはこれらに準じた方法等が挙げられる。以下に徐放性製剤として、例えばマイクロカプセルを製造する場合の製造方法について記述する。

【0033】

（a）水中乾燥法（S/O/W法）

本法によれば、まずタンパク質水溶液に水混和性の有機溶媒及び／又は揮発性塩類を添加した後、凍結乾燥によりタンパク質微細粉体（S）を作成する。次に生体内分解性ポリマーを有機溶媒に溶解し、この有機溶媒液中に上記のタンパク質微細粉体を添加し分散させる。この際、タンパク質と生体内分解性ポリマーとの比率（重量比）は、例えば約 1 : 1000 ないし約 1 : 1、好ましくは約 1 : 200 ないし約 1 : 5、更に好ましくは約 1 : 100 ないし約 1 : 5 である。

また、タンパク質微細粉体を有機溶媒液中に均一に分散させるため、外部物理的エネルギーを加えることが好ましい。その方法としては例えば、超音波照射、

タービン型攪拌器、ホモジナイザー等が用いられる。この時の有機溶媒液中でのタンパク質の平均粒子径としては約 $0.5 \sim 20 \mu\text{m}$ 、さらに好ましくは約 $0.7 \sim 10 \mu\text{m}$ 、より好ましくは約 $1 \sim 5 \mu\text{m}$ であることが望ましく、本発明の製造法により得られたタンパク質微細粉体を用いることにより達成される。

次いでこのようにして調製された有機溶媒分散液（S/O型分散液）を、更に水性溶媒（W）中に添加して、上記と同様の外部物理的エネルギー、例えば超音波照射、タービン型攪拌器、あるいはホモジナイザー等によりS/O/W型エマルションを形成させる。以後、油相溶媒を蒸発させマイクロカプセルを製造する。この際の水相体積は、一般的には油相体積の約1倍ないし約10,000倍から選ばれる。更に好ましくは約2倍ないし約5,000倍から選ばれる。特に好ましくは約5倍ないし約2,000倍から選ばれる。

上記外水相中には、乳化剤を加えてもよい。該乳化剤としては、一般的に安定なS/O/Wエマルションを形成できるものであれば何れでもよい。乳化剤としては、例えばアニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、レシチン、ゼラチン、ヒアルロン酸等が挙げられる。これらは適宜組み合わせて使用してもよい。外水相中の乳化剤の濃度は、好ましくは約 0.001% ないし 20% （w/w）である。更に好ましくは約 0.01% ないし 10% （w/w）、特に好ましくは約 0.05% ないし 5% （w/w）である。

このようにして得られたマイクロカプセルは、遠心分離あるいは濾過操作により分取した後、マイクロカプセルの表面に付着している乳化剤等を蒸留水による洗浄で除去し、再び蒸留水等に分散して凍結乾燥する。その後必要であれば、加温してマイクロカプセル中の水分及び有機溶媒を更に除去する。減圧下に加温してもよい。加温条件としては、用いた生体内分解性ポリマーのガラス転移温度以上で、マイクロカプセルの各粒子が互いに付着しない程度の温度で加熱乾燥する。好ましくは、生体内分解性ポリマーのガラス転移温度より 10°C 低い温度からガラス転移温度より約 20°C 高い温度の範囲で加熱乾燥する。ここでガラス転移温度とは、示差走査熱量計を用い、加温速度毎分 10 ないし 20°C で昇温した際に得られる中間点を云う。

【 0 0 3 4 】

(b) 相分離法 (コアセルベーション法)

本法においては、前記 (a) の S/O 型分散液にコアセルベーション剤を攪拌下徐々に加えマイクロカプセルを析出、固化させる。該コアセルベーション剤は、上記分散液の約 0.01 倍ないし約 1,000 倍の体積量が加えられる。更に好ましくは、約 0.05 倍ないし約 500 倍、特に好ましくは約 0.1 倍ないし約 200 倍の体積量である。コアセルベーション剤としては、生体内分解性ポリマーを溶解する有機溶媒と混和する高分子系、鉱物油系又は植物油系の化合物で使用した生体内分解性ポリマーを溶解しないものであればよい。具体的には、例えばシリコン油、ゴマ油、大豆油、コーン油、綿実油、ココナッツ油、アマニ油、鉱物油、n-ヘキサン、n-ヘプタン等が用いられる。これらは2種以上混合して用いてもよい。このようにして得られたマイクロカプセルを濾過分取した後、ヘプタン等により繰り返し洗浄してコアセルベーション剤を除去する。更に、(a)と同様に洗浄し、次いで凍結乾燥する。

水中乾燥法及びコアセルベーション法でのマイクロカプセルの製造では、粒子同士の凝集を防ぐために凝集防止剤を加えてもよい。該凝集防止剤としては、例えばマンニトール、ラクトース、ブドウ糖、デンプン類 (例えば、コーンスターチ等)、ヒアルロン酸あるいはこのアルカリ金属塩等の水溶性多糖、グリシン、フィブリン、コラーゲン等の蛋白質、塩化ナトリウム、リン酸水素ナトリウム等の無機塩類等が適宜用いられる。

【 0 0 3 5 】

(c) 噴霧乾燥法

本法においては、前記 (a) の S/O 型分散液を、ノズルを用いてスプレードライヤー (噴霧乾燥器) の乾燥室内へ噴霧し、極めて短時間に微粒化液滴内の有機溶媒を揮発させ、マイクロカプセルを製造する。該ノズルとしては、例えば二流体ノズル型、圧力ノズル型、回転ディスク型等がある。この際所望により、上記の分散液と同時に、マイクロカプセル粒子同志の凝集防止を目的として前記凝集防止剤の水溶液を別ノズルより噴霧することも有効である。このようにして得られたマイクロカプセルは、前記 (a) と同様にして洗浄し、必要であれば加温

(要すれば減圧下)により、水分及び有機溶媒を更に除去する。

【0036】

徐放性製剤は微粒子状であることが好ましい。なぜならば、徐放性製剤は皮下あるいは筋肉内注射に通常使用される注射針を通して投与される方が、患者に対し過度の苦痛を与えることがないからである。該徐放性製剤の粒子径は、例えば平均粒子径として約0.1ないし300 μm 、好ましくは約1ないし150 μm 、特に好ましくは約2ないし100 μm である。

徐放性製剤に含まれるタンパク質の含量は、例えば約0.1ないし40% (W/W)、好ましくは約0.2ないし20% (W/W) である。該タンパク質の平均粒子径は好ましくは約0.5~20 μm 以下、さらに好ましくは約0.7~10 μm 、より好ましくは約1~5 μm である。

また、徐放性製剤に含まれる生体由来物質または合成ポリマー（好ましくは生体内分解性ポリマー）の含量は、例えば約30ないし99.9% (W/W)、好ましくは約60ないし97% (W/W)、さらに好ましくは約70ないし90% (W/W) である。

徐放性製剤のタンパク質の初期放出率〔投与後1日（24時間）までの放出率〕は、好ましくは約50%以下、さらに好ましくは約1ないし40%、より好ましくは約3ないし35%である。なお、該初期放出率は本発明の徐放性製剤皮下投与後24時間までの血中濃度のAUC (Area Under the Concentration) を、タンパク質溶液皮下投与後24時間までのAUCから得られる投与量-AUC直線に適用させることにより初期放出量が得られ、さらに初期放出率が算出される。

【0037】

徐放性製剤は、例えばマイクロカプセルとして、あるいはマイクロカプセルを原料物質として種々の剤形に製剤化し、非経口剤（例えば、筋肉内、皮下、臓器等への注射剤又は埋め込み剤、鼻腔、直腸、子宮等への経粘膜剤等）、経口剤（例えば、カプセル剤（例えば、硬カプセル剤、軟カプセル剤等）、顆粒剤、散剤等の固形製剤、懸濁剤等の液剤等）等として投与することができる。

徐放性製剤は特に注射用であることが好ましい。例えば、徐放性製剤がマイク

ロカプセルである場合、マイクロカプセルを分散剤（例えば、Tween 80、HCO-60等の界面活性剤、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ヒアルロン酸等の多糖類等）、保存剤（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン等）、等張化剤（例えば、塩化ナトリウム、マンニトール、ソルビトール、ブドウ糖等）等と共に水性懸濁剤とすることにより実用的な注射用徐放製剤が得られる。また、ゴマ油、コーン油等の植物油あるいはこれにレシチン等のりん脂質を混合したもの、あるいは中鎖脂肪酸トリグリセリド（例えば、ミグリオール 8 1 2）と共に分散して油性懸濁剤として実際に使用できる徐放性注射剤とする。

【 0 0 3 8 】

徐放性製剤が例えばマイクロカプセルである場合、マイクロカプセルの平均粒子径は、懸濁注射剤として使用する場合には、その分散度、通針性を満足する範囲であればよく、例えば平均粒子径として約 0.1 ないし約 3 0 0 μm の範囲が挙げられる。平均粒子径は、好ましくは約 1 ないし約 1 5 0 μm 、特に好ましくは約 2 ないし約 1 0 0 μm の範囲である。

上記したマイクロカプセルを無菌製剤にするには、製造全工程を無菌にする方法、ガンマ線で滅菌する方法、防腐剤を添加する方法等が挙げられるが、特に限定されない。

【 0 0 3 9 】

該徐放性製剤は、低毒性で、哺乳動物（例えば、ヒト、牛、豚、犬、ネコ、マウス、ラット、ウサギ等）に対して安全に用いることができる。

徐放性製剤の適応は、使用するタンパク質により種々異なる。タンパク質が、例えばインスリンである場合には、糖尿病等、インターフェロン- α である場合には、ウイルス性肝炎（例えば、C型肝炎、HBe 抗原陽性活動性肝炎等）、癌（例えば、腎癌、多発性骨髄腫等）等、エリスロポエチンの場合には貧血（例えば、腎透析時貧血等）等、G-CSF の場合には好中球減少症（例えば、制ガン剤治療時）、感染症等、IL-2 の場合には癌（例えば、血管内皮腫等）等、FGF の場合には骨折、創傷（床ずれ等）、歯周病、消化管潰瘍等、FGF-9 の場合には血小板減少症等、NGF の場合には老人性痴呆、神経病（ニューロパシー）等、TPA の場合には血栓症等、腫瘍壊死因子の場合には癌等の治療又は予防

に有効である。また、GH含有徐放性製剤では、GHの成長ホルモン作用に基づき、下垂体性小人症の他、ターナー症候群、慢性腎疾患、軟骨異栄養症、更には成人性下垂体不全症に適応できる。また、GHはダウン症候群、シルバー症候群、骨形成不全症、あるいは若年性慢性関節症等の疾患にも適応され、有効な治療効果を得たとの報告もあり、GH含有徐放性製剤はこれらの疾患にも適応可能である。更にはうっ血性心不全症等の治療又は予防にも有効である。

【0040】

徐放性製剤の投与量は、タンパク質の種類と含量、放出の持続時間、対象疾病、対象動物等によって種々異なるが、該タンパク質の有効濃度が体内で保持される量であればよい。該タンパク質の投与量としては、例えば徐放性製剤が2週間型製剤である場合、好ましくは成人1人当たり約0.0001ないし約10mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。更に好ましくは約0.05ないし約1mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。投与回数は、1週間に1回、2週間に1回、1ヶ月に1回、2ヶ月に1回等、該タンパク質の種類と含量、剤型、放出の持続時間、対象疾病、対象動物等によって適宜選ぶことができる。好ましくは1週間ないし2ヶ月型徐放性製剤、さらに好ましくは1週間ないし1ヶ月型徐放性製剤が挙げられる。

徐放性製剤の有効成分であるタンパク質が、例えばインスリンである場合には、糖尿病の成人に対する投与量は、有効成分として通常、約0.001ないし約1mg/kg体重、好ましくは約0.01ないし約0.2mg/kg体重の範囲から適宜選び、1週間に1回投与するのがよい。

【0041】

徐放性製剤の有効成分であるタンパク質が、GHの場合には、投与量は、GHの種類と含量、放出の持続時間、対象疾病、対象動物等によって種々異なるが、該GHの有効濃度が体内で保持される量であればよい。前記した疾患の治療において、例えば徐放性製剤が2週間型製剤である場合、GHの投与量は有効成分として、好ましくは、小児あるいは成人1人当たり約0.01ないし約5mg/kg体重（約0.03ないし約15IU/kg体重）の範囲から適宜選択して安全に投与することができる。更に好ましくは約0.05ないし約1mg/kg体重（約0.

15ないし約3 IU/kg体重)の範囲から適宜選ぶことができる。投与回数は、1週間に1回、2週間に1回あるいは1ヶ月に1回等、GH含量、剤型、放出の持続時間、対象疾病、対象動物等によって適宜選ぶことができる。

該徐放性製剤は、常温あるいは冷所に保存することが好ましい。徐放性製剤は、冷所に保存することが更に好ましい。ここでいう常温あるいは冷所とは、日本薬局方において定義されるものである。すなわち、常温とは15ないし25℃を、冷所とは15℃以下を意味する。冷所のうち、とりわけ2ないし8℃が好ましい。

【0042】

【発明の実施の形態】

以下に実施例、比較例、参考例、応用例、参考応用例及び試験例を挙げて、更に具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

【0043】

【実施例】

実施例1

ウシ血清アルブミン(BSA)水溶液の予備凍結棚による凍結およびそれに引き続く真空乾燥(1)

BSA水溶液(最終BSA濃度=2mg/mL)に酢酸アンモニウムを20倍モル等量添加し、0.22 μ mのろ過を行い凍結乾燥液処方(処方1)を調製した。この液を10℃以下に冷却した後、一定量を5分ごとに、予備冷却した凍結乾燥棚上の-45~-40℃に冷却したトレイ(面積約1300cm²)に、滴下流体の直径約3mmで塗布し、凍結乾燥(トリオマスター-A04:共和真空(凝結量10kgタイプ))することにより、BSA凍乾末を製造した。塗布中のトレイ温度は-40~-30℃であった。このBSA凍乾末(S)140mgをPLGA1.85gおよび酸化亜鉛10mgをジクロロメタン2.7mLに溶解して得た液(O)中で、ポリトロン(キネマチカ社)処理にて分散させた。このS/O分散液100 μ Lにジクロロメタン2.5mLを添加した後、BSA凍乾末の平均粒子径をレーザー回折式粒度分布測定装置(SALD2000A:島津)を用いて測定した。

処方1を上記方法により急速凍結した場合のBSA凍乾末の粒子径を〔表1〕に示す。トレイへの塗布量を10mL/5分~80mL/5分と制御することにより、処方1

の平均冷却速度が $-108.7^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最大 $-156^{\circ}\text{C}/\text{分}$) $\sim -35.1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最小 $-32.4^{\circ}\text{C}/\text{分}$)となり、B S A凍乾末の粒子径は $1.2\mu\text{m}\sim 6.1\mu\text{m}$ まで制御することが可能であった。

【表 1】

	塗布量(5分当たり塗布量(mL)/トレ-)						
	10	25	40	50	60	70	80
平均粒子径(μm)	1.2	2.8	3.1	2.5	3.5	4.2	6.1
平均冷却速度($^{\circ}\text{C}/\text{分}$)	-108.7	-92.1	-66.0	-68.8	-58.3	-49.4	-35.1

【0044】

実施例 2

B S A水溶液の予備凍結棚による凍結およびそれに引き続く真空乾燥 (2)

実施例 1と同様に処方 1のB S A水溶液を調製し、この液を室温とし、一定量を5分ごとに、予備冷却した凍結乾燥棚上の $-45\sim -40^{\circ}\text{C}$ に冷却したトレ- (面積約 1300cm^2)に、滴下流体の直径約 3mm で塗布し、凍結乾燥(RL-603BS:共和真空(凝結量 60kgタイプ))することにより、B S A凍乾末を無菌的に製造した。塗布中のトレ-温度は $-40\sim -30^{\circ}\text{C}$ であった。このB S A凍乾末を実施例 1記載の方法で粒子径を測定した。

処方 1を上記方法により急速凍結した場合のB S A凍乾末の粒子径を【表 2】に示す。トレ-への塗布量を $30\text{mL}/5\text{分}\sim 60\text{mL}/5\text{分}$ と制御することにより、処方 1の平均冷却速度が $-98.9^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最大 $-101.1^{\circ}\text{C}/\text{分}$) $\sim -80.6^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最小 $-70.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$)となり、B S A凍乾末の粒子径は $1.2\mu\text{m}\sim 5.0\mu\text{m}$ まで制御することが可能であった。

【表 2】

	塗布量(5分当たり塗布量(mL)/トレ-)			
	30	40	50	60
平均粒子径(μm)	1.2	1.9	2.4	5.0
平均冷却速度($^{\circ}\text{C}/\text{分}$)	-98.9	-97.7	-95.4	-80.6

【 0 0 4 5 】

実施例 3

h G H 水溶液の予備凍結棚による凍結およびそれに引き続く真空乾燥 (1)
 遺伝子組み換え型 h G H 水溶液 (最終 h G H 濃度 = 2 mg/mL) に酢酸アンモニウム
 を 20 倍モル等量添加し、 $0.22\mu\text{m}$ のろ過を行い凍結乾燥液処方 (処方 2) を調製
 した。この液を 10°C 以下に冷却し、その一定量を 5 分ごとに、予備冷却した凍
 結乾燥棚上の $-45\sim-40^{\circ}\text{C}$ に冷却したトレー (面積 1300cm^2) に、滴下流体の直径約
 3mm で塗布し、凍結乾燥 (トリオスター-A04) することにより凍結乾燥粉末 (以下、h G H
 凍乾末と略記する) を製造した。塗布中のトレー温度は $-40\sim-30^{\circ}\text{C}$ であった。こ
 の h G H 凍乾末を実施例 1 記載の方法で粒子径を測定した。

処方 2 を上記方法により急速凍結した場合の h G H 凍乾末の粒子径を [表 3]
 に示す。トレーへの塗布量を $10\text{mL}/5\text{分}\sim 86\text{mL}/5\text{分}$ と制御することにより、処方 2
 の平均冷却速度が $-201.0^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最大 $-203.7^{\circ}\text{C}/\text{分}$) $\sim -72.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最小 $-54.6^{\circ}\text{C}/\text{分}$)
 となり、h G H 凍乾末の粒子径は $1.4\mu\text{m}\sim 4.7\mu\text{m}$ まで制御することが可能であっ
 た。

【表 3】

	塗布量 (5分当たり塗布量 (mL) / トレー)			
	10	60	70	86
平均粒子径 (μm)	1.4	2.3	3	4.7
平均冷却速度 ($^{\circ}\text{C}/\text{分}$)	-201.0	-88.7	-84.1	-72.5

【 0 0 4 6 】

実施例 4

h G H 水溶液の予備凍結棚による凍結およびそれに引き続く真空乾燥 (2)

処方 2 の h G H 水溶液を調製し、この液を室温とし、一定量を 5 分ごとに、予
 備冷却した凍結乾燥棚上の $-45\sim-40^{\circ}\text{C}$ に冷却したトレー (面積約 1300cm^2) に、滴
 下流体の直径約 3mm で塗布し、凍結乾燥 (RL-603BS: 共和真空 (凝結量 $60\text{kg}/\text{タイプ}$)) す
 ることにより h G H 凍乾末を無菌的に製造した。塗布中のトレー温度は $-40\sim-3$
 0°C であった。この h G H 凍乾末を実施例 1 記載の方法で粒子径を測定した。

処方 2 を上記方法により急速凍結した場合の h G H 凍乾末の粒子径を〔表 4〕に示す。トレーへの塗布量を 50mL/5 分～80mL/5 分と制御することにより、処方 1 の平均冷却速度が $-84.6^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最大 $-87.4^{\circ}\text{C}/\text{分}$)～ $-67.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最小 $-54.9^{\circ}\text{C}/\text{分}$)となり、B S A 凍乾末の粒子径は $2.7\mu\text{m}$ ～ $5.5\mu\text{m}$ まで制御することが可能であった。

【表 4】

	塗布量 (5 分当たり塗布量 (mL)/トレ-)			
	50	60	70	80
平均粒子径 (μm)	2.7	2.7	3.2	5.5
平均冷却速度 ($^{\circ}\text{C}/\text{分}$)	-84.6	-80.6	-76.6	-67.3

【0 0 4 7】

実施例 5

B S A 水溶液の連続滴下による凍結およびそれに引き続く真空乾燥

処方 1 の B S A 水溶液を調製し、この液を室温とし、連続的に一定量を小滴ずつ、予備冷却した凍結乾燥棚上の $-45\sim-40^{\circ}\text{C}$ に冷却したトレー (面積約 1300cm^2) に、滴下流体の直径約 $2\sim 3\text{mm}$ で滴下し、凍結乾燥 (トリオマスター-A04: 共和真空 (凝結量 $10\text{kg}/\text{day}$)) することにより B S A 凍乾末を製造した。滴下中のトレー温度は、滴下量が、60mL の時は $-40\sim-32^{\circ}\text{C}$ 、80mL の時は $-32\sim-22^{\circ}\text{C}$ 、140mL の時は $-34\sim-9^{\circ}\text{C}$ 、160mL の時は $-26\sim-8^{\circ}\text{C}$ 、150mL の時は $-22\sim-4^{\circ}\text{C}$ であった。この B S A 凍乾末を実施例 1 記載の方法で粒子径を測定した。

処方 1 を上記方法により連続滴下により凍結した場合の B S A 凍乾末の粒子径を〔表 5〕に示す。トレーへの滴下量を 60mL/5 分～160mL/5 分と制御することにより、処方 1 の平均冷却速度が $-92.6^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最大 $-101.1^{\circ}\text{C}/\text{分}$)～ $-33.4^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最小 $-32.6^{\circ}\text{C}/\text{分}$)となり、B S A 凍乾末の粒子径は $1.3\mu\text{m}$ ～ $20.0\mu\text{m}$ まで制御することが可能であった。

【表 5】

	滴下量(5分当たり塗布量(mL)/トレ-)				
	60	80	140	160	150 チ-ブ 径変更
平均粒子径(μm)	1.3	1.4	2.4	3.8	20.0
平均冷却速度($^{\circ}\text{C}/\text{分}$)	-92.6	-85.3	-71.7	-49.7	-33.4

【0048】

実施例 6

h G H 水溶液の連続滴下による凍結およびそれに引き続く真空乾燥

処方 2 の h G H 水溶液を調製し、この液を室温とし、連続的に一定量を小滴ずつ、予備冷却した凍結乾燥棚上の $-45\sim-40^{\circ}\text{C}$ に冷却したトレ- (面積約 1300cm^2) に、滴下流体の直径約 $2\sim 3\text{mm}$ で滴下し、凍結乾燥(トリオスタ-A04: 共和真空(凝結量 $10\text{kg}/\text{h}^{\circ}$))することにより h G H 凍乾末を製造した。滴下中のトレ-温度は、滴下量が、 40mL の時は $-38\sim-18^{\circ}\text{C}$ 、 160mL の時は $-28\sim-2^{\circ}\text{C}$ であった。この h G H 凍乾末を実施例 1 記載の方法で粒子径を測定した。

処方 2 を上記方法により連続滴下により凍結した場合の h G H 凍乾末の粒子径を【表 6】に示す。トレ-への滴下量を $140\text{mL}/5\text{分}\sim 160\text{mL}/5\text{分}$ と制御することにより、処方 2 の平均冷却速度が $-74.1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最大 $-79.2^{\circ}\text{C}/\text{分}$) $\sim -42.6^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最小 $-39.8^{\circ}\text{C}/\text{分}$)となり、h G H 凍乾末の粒子径は $1.9\mu\text{m}\sim 5.9\mu\text{m}$ まで制御することが可能であった。

【表 6】

	滴下量(5分当たり塗布量(mL)/トレ-)	
	140	160
平均粒子径(μm)	1.9	5.9
平均冷却速度($^{\circ}\text{C}/\text{分}$)	-74.1	-42.6

【0049】

参考例 1

B S A 水溶液の予備凍結による凍結真空乾燥

処方 1 の B S A 水溶液を調製し、この液を層厚が 1mm、2mm、5mm となるようにトレーに加え、予備冷却した凍結乾燥機(トリオスター-A04:共和真空(凝結量10kgタイプ))で凍結乾燥し凍結乾燥粉末(以下、B S A 凍乾末と略記する)を製造した。この B S A 凍乾末を実施例 1 記載の方法で粒子径を測定した。

処方 1 を上記方法により急速凍結した場合の B S A 凍乾末の粒子径を〔表 7〕に示す。トレー凍結乾燥法では、冷却速度は約 $-2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ となり、B S A 凍乾末の粒子径は約 $30\mu\text{m}$ となった。

【表 7】

	層 厚		
	1mm	2mm	5mm
平均粒子径(μm)	35.0	38.9	28.9
平均冷却速度($^{\circ}\text{C}/\text{分}$)	-2.1	-1.6	-2.1

【0 0 5 0】

参考例 2

B S A 水溶液の緩慢凍結による凍結真空乾燥

処方 1 を調製し、層厚が 1mm となるようにトレーに加え、凍結乾燥機に仕込み、処方 1 の凍結温度の 2°C 高い温度に処方 1 の温度を制御した。次に棚温度を $-4^{\circ}\text{C}/\text{h}$ で冷却し凍結させ、凍結乾燥機(トリオスター-A04:共和真空(凝結量10kgタイプ))により凍結乾燥し B S A 凍乾末を製造した。この B S A 凍乾末を実施例 1 記載の方法で粒子径を測定した。

処方 1 を上記方法により凍結した場合の B S A 凍乾末の粒子径を〔表 8〕に示す。B S A 凍乾末の粒子径は約 $30\mu\text{m}$ となった。

【表 8】

	層 厚
	1mm
平均粒子径 (μm)	32.5
平均冷却速度 ($^{\circ}\text{C}/\text{分}$)	-4

【0051】

実施例 1 ～ 6 および参考例 1, 2 を比べた結果、凍結速度が $-10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ より遅いと、タンパク質凍結乾燥粉体の平均粒子径が $20\mu\text{m}$ 以上になることが確認された。

【0052】

実施例 7

h G H 水溶液の噴霧凍結およびそれに引き続く真空乾燥

処方 2 の h G H 水溶液を調製し、この液を室温とし、断続的に一定量を、予備冷却した凍結乾燥棚上の -25°C 以下に冷却したトレー (面積約 1300cm^2) に噴霧し、凍結乾燥 (トリオマスター-A04: 共和真空 (凝結量 $10\text{kg}/\text{タイ}$)) することにより h G H 凍乾末を製造した。この h G H 凍乾末を実施例 1 記載の方法で粒子径を測定した。

処方 2 を上記方法により噴霧凍結した場合の h G H 凍乾末の粒子径を [表 9] に示す。トレーへの噴霧量を $50\text{mL}/5\text{分} \sim 100\text{mL}/5\text{分}$ と制御することにより、処方 2 の平均冷却速度が $-65.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最大 $-73.9^{\circ}\text{C}/\text{分}$) $\sim -37.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (最小 $-34.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$) となり、h G H 凍乾末の粒子径は $1.5\mu\text{m} \sim 9.5\mu\text{m}$ まで制御することが可能であった。

【表 9】

	噴霧量 (5分当たり塗布量 (mL) /トレー)		
	50	80	100
平均粒子径 (μm)	1.5	2.9	9.5
平均冷却速度 ($^{\circ}\text{C}/\text{分}$)	-65.3	-43.3	-37.3

【 0 0 5 3 】

実施例 8

h G H 含有マイクロカプセルの製造

乳酸－グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール酸＝50／50、ポリスチレン換算平均分子量＝12,000、粘度＝0.145dl/g）1.85gと酸化亜鉛10mgとをジクロロメタン3.0mlに溶解した。この有機溶媒液に、実施例3中、塗布量（5分当たり塗布量（mL）/トレイ）が10および60において得られた、h G H 粉体140mgを添加し、ポリトロン（キネマチカ社）を用いて微粒化した。このS/O分散液を0.1%ポリビニルアルコール水溶液800mlに添加し、ホモミキサーを用いて攪拌・乳化した。室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させた後、遠心分離（約1,800rpm）することによりマイクロカプセルを分取した。次いで蒸留水400mlを用いて2回洗浄後、D－マンニトール0.2gを添加し凍結乾燥した。更に残留溶媒除去のため、46℃で3日間真空乾燥して2種のh G H 含有マイクロカプセルを得た。

【 0 0 5 4 】

実施例 9

h G H 含有マイクロカプセルの製造

実施例8と同様の操作により、実施例7における噴霧量（5分当たり塗布量（mL）/トレイ）が50および80において得られたh G H 粉体2種のh G H 含有マイクロカプセルを得た。

【 0 0 5 5 】

試験例 1

in vivo放出性

免疫抑制SDラット（雄性、6週齢）に実施例8および9で得たマイクロカプセルを皮下投与し（h G H 量として6mg/ラット）、経時的に採血後、その血清中のh G H 濃度をラジオイムノアッセイ（AbビーズHGH：栄研化学）により測定し、h G H 徐放性を評価した。免疫抑制SDラットは、プログラフ（藤沢薬品）を、マイクロカプセル投与3日前に0.4mg/ラット、投与時、4日後、7日後、11日後及び14日後にそれぞれ0.2mg/ラットを皮下投与して作成した

。結果を〔図 1〕に示す。

【0056】

【図 1】

〔図 1〕の結果から明らかなように、微粒化した hGH 粉体を用いた製剤はいずれも良好な薬物放出性（血中濃度）を示した。その中でも、特に塗布して得られた hGH 粉体を用いて作成したマイクロカプセル投与後の血中 hGH 濃度は高かった。これらの結果は、すなわち塗布して得られた hGH 粉体を用いて作成したマイクロカプセル製剤のバイオアベイラビリティーが高いことを示している。

【0057】

試験例 2

FT-IR によるタンパク質微細粉体の高次構造解析

実施例 4 中、塗布量（5 分当たり塗布量（mL）/トレー）が 80 において得られた hGH 粉体および、実施例 7 中、噴霧量（5 分当たり塗布量（mL）/トレー）が 80 において得られた hGH 粉体の 2 種の粉体に対し、FT-IR による高次構造解析を行った（ジャーナル オブ ファーマシューティカル サイエンス（Journal of Pharmaceutical Science）87 巻 1412-1420 頁 1998 年参照）。その結果を $n=3$ の平均 \pm SD として、〔表 10〕に示す。〔表 10〕に示すように、噴霧して得られた実施例 7 の hGH 微細粉体の α -ヘリックス含量は、塗布して得られた実施例 4 の hGH 微細粉体の α -ヘリックス含量に比べて明らかに低下していた。重水中における hGH の α -ヘリックス含量は 59% であることから、噴霧して得られた実施例 7 の hGH 粉体では、重水中に対し 39% に低下した。一方、塗布して得られた実施例 4 の hGH 粉体は、重水中に対し 53% の α -ヘリックスを保持していた。

【表 1 0】

実施例 4 塗布量：5 分当たり塗布量 80mL/トレー		実施例 7 噴霧量：5 分当たり塗布量 80mL/トレー		
波数 (cm ⁻¹)	割合	波数 (cm ⁻¹)	割合	帰属
1694.3±0.3	3.5±1.3	1694.3±0.2	3.5±0.4	β-sheet
1682.9±0.6	18.9±0.4	1684.8±0.1	13.7±0.2	unordered
1667.3±1.8	22.3±0.9	1666.9±0.6	35.7±1.7	unordered
1654.7±0.6	31.2±2.0	1653.5±0.2	23.3±2.0	α-helix
1641.5±0.4	14.6±0.7	1641.8±0.3	13.8±0.7	unordered
1630.1±0.3	6.0±0.9	1630.7±0.4	6.5±0.7	β-sheet
1615.8±0.2	3.6±0.1	1615.8±0.1	3.5±0.1	unordered

【0 0 5 8】

【発明の効果】

本発明によれば、高次構造を高く保持した安定なタンパク質微細粉体を、液化ガスに接触させることなく、簡便に製造することができる。従って、液化ガス中に噴霧し凍結後に乾燥するタンパク質微細粉体の製造法に比べて、断熱、温度差による機器材質の膨張収縮、無菌保持への対応、液化ガスの排気のための大がかりで高価な設備を用いる必要がない。

さらに、本発明の方法で得られたタンパク質微細粉体を用いることにより長期間に亘り安定した高い血中濃度を示す徐放性製剤を提供することができる。

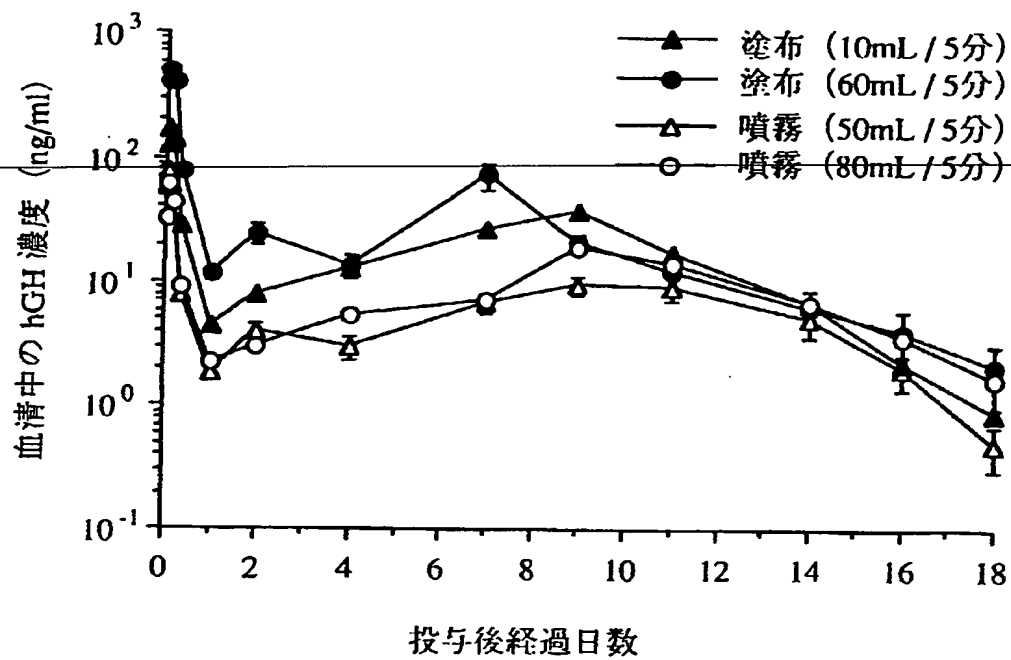
【0 0 5 9】

【図面の簡単な説明】

【図 1】免疫抑制 S D ラットにおける、それぞれ、塗布〔塗布量：10 mL/5 分（—▲—），60 mL/5 分（—●—）〕および噴霧〔噴霧量：50 mL/5 分（—△—），80 mL/5 分（—○—）〕により凍結させて得られた h G H 粉体を用いて作成したマイクロカプセル投与後の血清中 h G H 濃度推移を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高次構造を高く保持した安定なタンパク質微細粉体を、液化ガスに接触させることなく、簡便に提供する。

【解決手段】 タンパク質含有溶液を約-300~-10℃/分の冷却速度で凍結後、乾燥することを特徴とするタンパク質微細粉体の製造法。

【効果】 本発明によれば、高次構造を高く保持した安定なタンパク質微細粉体を、液化ガスに接触させることなく、簡便に製造することができる。さらに本発明の方法で得られたタンパク質微細粉体を用いることにより、長期間に亘り安定した高い血中濃度を示す徐放性製剤を提供することができる。

【選択図】 なし。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 2 9 3 4]

1. 変更年月日	1 9 9 2 年 1 月 2 2 日
[変更理由]	住所変更
住 所	大阪府大阪市中央区道修町四丁目 1 番 1 号
氏 名	武田薬品工業株式会社

